

## 論文審査の結果の要旨

氏名 久保 葉子

本論文は2章からなり、第1章ではカイコのテロメアで見つかった non-LTR 型レトロトランスポゾンがテロメアへ特異的に挿入するために関与している領域の探索を試み、第2章では、non-LTR 型レトロトランスポゾンが転移するときに必須な酵素タンパク質をコードする Open Reading Frame 2 (ORF2) を、逆転写酵素ドメインを中心に機能解析を試みた。

レトロトランスポゾンの殆どは、ゲノム上にランダムに転移するが、カイコのテロメアで見つかった non-LTR 型レトロトランスポゾン TRAS と SART は、テロメア反復配列 (TTAGG)<sub>n</sub> に特異的に転移する特徴を持ち、転移の標的配列を限定している稀なレトロトランスポゾンである。論文提出者は TRAS と SART の研究を行い、詳細なメカニズムが未解明である non-LTR 型レトロトランスポゾンの転移機構の解明を目指し、研究を行った。

第1章ではカイコのテロメアから TRAS1 以外の TRAS 配列を同定し、これらを 5'-UTR や 3'-UTR の配列で分類し、TRAS は最低6種類、SART は少なくとも2種類のファミリーが存在することを明らかにした。non-LTR 型レトロトランスポゾンは、逆転写が自身の RNA の 3'-UTR 側から始まることから、一般に5'側の欠損した配列がゲノム中に挿入されていることが多いが、TRAS は、全て転写開始点からテロメアに挿入されていた。テロメアでは遺伝子変換や組換えが頻繁に起こるため、完全長の TRAS が維持されている可能性が考えられた。次に TRAS の進化的起源を探るため、カイコ以外の昆虫に TRAS が存在するかどうか、ゲノムサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、カイコ以外の昆虫目にも幅広く TRAS が存在することがわかった。おそらく昆虫が多く種の分岐する以前から、昆虫のゲノム中に TRAS が存在していたと考えられる。次に、TRAS がテロメア反復配列に特異的に挿入するのに関与する領域を探索するため、カイコ以外の昆虫からも TRAS 配列同定を試み、カイコを含む鱗翅目昆虫3種から、新たに7種の TRAS 配列を同定した。これらを TRAS 以外の標的配列特異的レトロトランスポゾンと配列を比較した結果、TRAS ファミリー間で保存性の高い領域4箇所を同定でき、このうち1つは Myb という DNA 結合モチーフに類似することがわかった。TRAS が属するタイプの non-LTR 型レトロトランスポゾンで Myb ドメインが見つかったのは、今回が初めての報告である。また Myb ドメインは、テロメア結合タンパク質でも、テロメアに結合するためのドメインとして機能しており、TRAS で見つかった Myb ドメインも、TRAS のテロメ

アへの挿入に關与する可能性が考えられた。

第2章では、解析が進んでいない non-LTR 型レトロトランスポゾンの転移機構を解明する目的で、酵素タンパク質がコードされている ORF2 ドメインを、逆転写酵素ドメインを中心に解析を行った。SART1 の逆転写酵素ドメイン内で保存性の高いアミノ酸 11 箇所、一アミノ酸置換を導入した SART1 を解析した結果、D609A, D699V の変異 SART1 が転移できなくなっていた。これらの D (アスパラギン酸) は活性中心を構成するため予想と矛盾しない結果だったが、K548A, G775A でも転移頻度の極端な低下が見られた。これらのアミノ酸でも逆転写酵素活性に何らかの役割を果たすと考えられた。興味深いことに、他の 7 箇所の変異は、転移への影響が見られなかった。この結果から、保存性の高いアミノ酸のうち、機能に關与するアミノ酸は限られていることがわかった。次に、逆転写酵素ドメインの近傍領域の、転移における機能を探るため、逆転写酵素ドメインの上流領域及び C 末領域を欠損した SART1 を作成したところ、これらの欠損 SART1 は全て転移できなくなり、近傍の領域も何らかの機能を持つことが示唆された。上流欠損 SART1 と C 末欠損 SART1 を同時に発現させると転移できたことから、逆転写酵素ドメインを含む ORF2 タンパク質はダイマー以上で機能し、その際逆転写酵素ドメインの上流と C 末の領域が同時に必要なことが示唆された。可能性の一つとして、これら 2 つの領域が相互作用することで、ORF2 タンパク質はダイマー以上のマルチマーを形成すると考えられる。non-LTR 型レトロトランスポゾンの ORF2 タンパク質が、マルチマーを形成するとの報告は今回が初めてである。さらに論文提出者は、*in vivo* 転移系で逆転写酵素ドメインの解析を詳細に検討するには、逆転写酵素活性のアッセイ系が必要であると考え、この系を今回新しく構築した。この系を用いて、加える鋳型 RNA の配列を変えることで、RNA のどのような配列あるいは構造が逆転写に重要かを調べることができ、non-LTR 型レトロトランスポゾンの更なる機能解析に強力な系を構築したと言える。

なお、本論文は藤原晴彦、岡崎聡、安西智宏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行っており、その寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。